

固定化核苷磷酸化酶的制备及其性质研究

黄炯威¹, 刘 宁², 劳伟明¹, 周华润¹, 刘桂祯¹

(1. 开平牵牛生化制药有限公司, 广东 江门 529339; 2. 厦门大学生命科学院, 福建 厦门 361000)

摘要: 目的 优化核苷磷酸化酶的固定化工艺, 并对固定化酶的性质进行研究。方法 通过正交试验优化核苷磷酸化酶(包括嘌呤和嘧啶核苷磷酸化酶)固定化条件, 并进一步对固定化核苷磷酸化酶的最适 pH、温度及其稳定性进行研究。结果 固定化酶条件为 pH=8.0, 温度为 25℃, 蛋白载量为 20 mg/g 载体, 固定化时间为 6 h; 固定化核苷磷酸化酶的最适 pH=7.5, 最适温度为 40℃, 固酶连续使用 20 批次酶活力无明显损失。结论 固定化核苷磷酸化酶稳定可靠, 适合应用于工业化生产。

关键词: 核苷磷酸化酶; 固定化; 制备

中图分类号: IQ460.6; R977.6

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2015)20-0032-03

Preparation of Immobilized Nucleoside Phosphorylase and Research on Its Property

Huang Jiongwei¹, Liu Ning², Lao Weiming¹, Zhou Huarun¹, Liu Guizhen¹

(1. Kaiping Genuine Biochemical Pharmaceutical Co., Ltd., Jiangmen, Guangdong, China 529339; 2. Life Science Department, Xiamen University, Xiamen, Fujian, China 361000)

Abstract: **Objective** To optimize the immobilization process of the nucleoside phosphorylase and research on its property. **Methods** The immobilization process of the nucleoside phosphorylase (including purine and pyrimidine nucleoside phosphorylase) was optimized by orthogonal test, and took further study of the finest pH, temperature and stability of immobilized nucleoside phosphorylase. **Results** The finest condition of immobilized enzyme was pH=8.0, 25℃, 20 mg/g protein loads and immobilize for 6 h; the finest condition for the immobilized nucleoside phosphorylase to catalyze was pH=7.5 and 40℃. There was no significant loss of activity of the enzyme after use for catalyzing 20 batches consecutively. **Conclusion** The immobilized nucleoside phosphorylase is stable and reliable, which is suitable to application in industrial production.

Key words: nucleoside phosphorylase; immobilized; preparation

核苷磷酸化酶可分为嘌呤核苷磷酸化酶(PNPase, EC2.4.2.1)和嘧啶核苷磷酸化酶(PyNPase, EC2.4.2.2)^[1-2]。此酶能可逆地催化核苷(或脱氧核苷)磷酸化反应, 其反应式为^[3]: Rib(或dRib)-碱基1+Pi→Rib(或dRib)-1-磷酸+碱基1, Rib(或dRib)-1-磷酸+碱基2→Rib(或dRib)-碱基2+Pi。利用核苷磷酸化酶已成功合成了阿糖腺苷(Ara2A)、2'-脱氧腺苷(2'-Deoxyade-2-nosine, dAR)、三氮唑核苷(Ribavirin)、5-氟尿苷(5-FUR)等^[4-5]。在工业生产应用中, 与游离酶相比, 固定化酶具有稳定性高、酶可反复使用、产物纯度高、产物分离简单等优点, 本研究中对嘌呤核苷磷酸化酶和嘧啶核苷磷酸化酶的固定化条件进行了充分研究, 并进一步研究了固定化核苷磷酸化酶(简称固定化酶)的最适 pH、温度及稳定性。

1 材料、仪器与方法

1.1 材料与仪器

嘌呤核苷磷酸化酶液和嘧啶核苷磷酸化酶液^[2]为开平牵牛生化制药有限公司自制; 固酶载体 GZ011 为本公司实验室自选共价结合型载体; 腺苷、胞苷及其他检测用试剂均为国产分析纯试剂。LC-15C 型高效液相色谱仪(岛津仪器<苏州>有限公司); TU-1901 型分光光度计(北京普析通用仪器公司); VE-180 型电泳槽(上海天能公司); Eumix-R30 型搅拌机(上海弗鲁克公司)。

1.2 方法^[5]

酶活力定义及测定: 以腺苷和胞苷为底物, 分别加入一定量的嘌呤核苷磷酸化酶和嘧啶核苷磷酸化酶催化反应, 准确计时, 用高效液相色谱仪监测腺嘌呤和胞嘧啶的生成量, 计算酶活力, 其定义为每分钟单位酶量催化生成的腺嘌呤或胞嘧啶的微摩尔量。

蛋白检测: 以牛血清白蛋白(BSA)配制标准蛋白溶液, 按考

马斯亮蓝法(Bradford 法)制作标准曲线及检测样品蛋白含量。

酶固定化: 嘌呤核苷磷酸化酶和嘧啶核苷磷酸化酶经提取纯化后, 加入适当 pH 的缓冲液稀释, 以及一定量的 GZ011 载体, 在适当温度下搅拌固定化, 固定化完成后过滤分离固定化酶与残酶液, 固定化酶用 pH 缓冲液洗涤数次, 取固定化酶样品进行酶活力检测。

固定化酶性质研究: 以腺苷和胞苷为底物, 分别加入一定量的嘌呤核苷磷酸化酶和嘧啶核苷磷酸化酶催化反应, 改变反应液 pH 和温度, 用高效液相色谱仪监测腺嘌呤和胞嘧啶的生成量, 计算底物转化率, 根据不同反应条件下的转化率找出固定化酶的最适 pH 和最适温度。取固酶样品连续投料反应多个批次, 监测不同反应批次后的固酶的酶活力损失情况, 分析固定化酶的稳定性。

2 结果

2.1 固定化方法优化

采用 L₉(3⁴) 正交试验方案, 其中固定化温度选择 15、20、30℃ 3 个水平, 固定化酶载体的蛋白载量为 15、20、30 mg/g 3 个水平, 固定化 pH 条件选择了 7.0、8.0、9.0 3 个水平, 固定化时间为 4、6、8 h 3 个水平, 通过正交试验以较少的试验次数来优化固定化酶的条件, 结果见表 1。可见 4 个考察因素中固定化 pH 对固定化酶活力影响最大, 其次是蛋白载量, 影响最小的是固定化时间, 考虑到固定化温度越高, 对固定化前液酶的稳定性越不利, 最终确定了固定化酶的最佳条件, 即固定化温度为 25℃, 固定化载体蛋白载量为 20 mg/g, 固定化 pH=8.0, 固定化时间为 6 h。

2.2 固定化酶的最适 pH

以催化合成阿糖腺苷试验研究固定化酶的性质, 在含 20 mmol/L 阿糖尿苷、10 mmol/L 腺嘌呤和 50 mmol/L 磷酸盐、

表 1 固定化嘌呤核苷磷酸化酶及固定化嘧啶核苷磷酸化酶正交试验结果

试验号	温度		蛋白载量		pH		时间		酶活(U/g)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	1(15℃)	1(15℃)	1(15 mg/g)	1(15 mg/g)	1(7.0)	1(7.0)	1(4 h)	1(4 h)	0.82	0.99
2	1(15℃)	1(15℃)	2(20 mg/g)	2(20 mg/g)	2(8.0)	2(8.0)	2(6 h)	2(6 h)	1.04	1.32
3	1(15℃)	1(15℃)	3(25 mg/g)	3(25 mg/g)	3(9.0)	3(9.0)	3(8 h)	3(8 h)	0.84	1.08
4	2(20℃)	2(20℃)	1(15 mg/g)	1(15 mg/g)	2(8.0)	2(8.0)	3(8 h)	3(8 h)	0.97	1.22
5	2(20℃)	2(20℃)	2(20 mg/g)	2(20 mg/g)	3(9.0)	3(9.0)	1(4 h)	1(4 h)	0.91	1.15
6	2(20℃)	2(20℃)	3(25 mg/g)	3(25 mg/g)	1(7.0)	1(7.0)	2(6 h)	2(6 h)	0.90	1.14
7	3(25℃)	3(25℃)	1(15 mg/g)	1(15 mg/g)	3(9.0)	3(9.0)	2(6 h)	2(6 h)	0.94	1.20
8	3(25℃)	3(25℃)	2(20 mg/g)	2(20 mg/g)	1(7.0)	1(7.0)	3(8 h)	3(8 h)	0.92	1.16
9	3(25℃)	3(25℃)	3(25 mg/g)	3(25 mg/g)	2(8.0)	2(8.0)	1(4 h)	1(4 h)	1.04	1.31
I	2.70	3.39	2.64	3.29	2.64	3.29	2.77	3.46		
II	2.78	3.51	2.87	3.63	3.05	3.85	2.88	3.66		
III	2.90	3.67	2.78	3.53	2.69	3.43	2.73	3.46		
K ₁	0.90	1.13	0.88	1.10	0.88	1.10	0.92	1.15		
K ₂	0.93	1.17	0.96	1.21	1.02	1.28	0.96	1.22		
K ₃	0.97	1.22	0.93	1.18	0.90	1.14	0.91	1.15		
R	0.07	0.09	0.08	0.11	0.14	0.19	0.05	0.07		

注: A 为固定化嘌呤核苷磷酸化酶, B 为固定化嘧啶核苷磷酸化酶。

不同 pH 的反应液中,加入一定量的固定化嘌呤核苷磷酸化酶和固定化嘧啶核苷磷酸化酶,35℃条件下搅拌反应 8 h,反应完成后用高效液相色谱仪测定底物阿糖尿苷和生成的阿糖尿苷量,计算反应转化率。结果见图 1。可见,在反应液 pH 为 6.0~9.0 范围内, pH 为 7.5 时底物转化率最高。

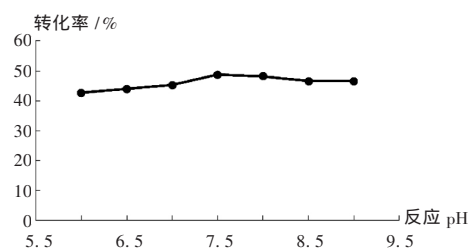


图 1 不同反应 pH 的转化率

2.3 固定化酶的最适温度

在含 20 mmol/L 阿糖尿苷、10 mmol/L 腺嘌呤、50 mmol/L 磷酸盐和 pH=7.5 的反应液中,加入一定量的固定化嘌呤核苷磷酸化酶和固定化嘧啶核苷磷酸化酶,在不同温度条件下搅拌反应 8 h,反应完成后用高效液相色谱仪测定底物阿糖尿苷和生成的阿糖尿苷量,计算反应转化率。结果见图 2。可见,在试验温度范围内,温度越高,底物转化率越高,温度升到 35℃ 以上后,转化率升高幅度变小。考虑到过高的反应温度可能会影响固定化酶的使用寿命,固定化酶的最佳使用温度暂定为 40℃。

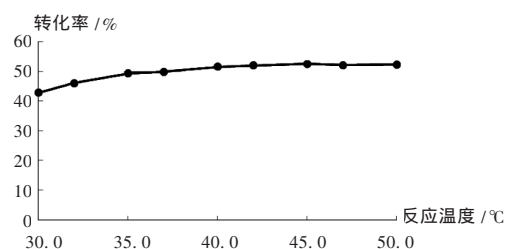


图 2 不同反应温度的转化率

2.4 固定化酶的稳定性

在含 20 mmol/L 阿糖尿苷、10 mmol/L 腺嘌呤、50 mmol/L 磷酸盐和 pH=7.5 的反应液中,加入一定量的固定化嘌呤核苷磷酸化酶和固定化嘧啶核苷磷酸化酶,在 40℃ 条件下搅拌反应 8 h,反应完成后用高效液相色谱仪测定底物阿糖尿苷和生成的阿糖尿苷量,计算反应转化率。结果见图 3。可见,固定化酶的稳定性非常好,在连续使用 20 批次后酶活力依然无明显失活现象。

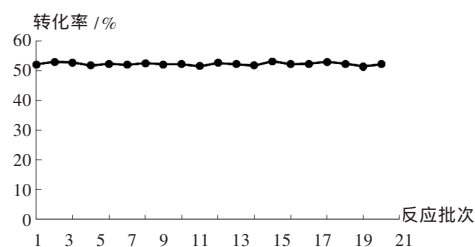


图 3 连续多批反应转化率

3 讨论

利用核苷磷酸化酶合成核苷类药物应用前景非常好,而固定化酶催化技术在工业生产应用方面具有很大优势。本研究中采用了 $L_9(3^4)$ 正交试验方案对核苷磷酸化酶的固定化过程中的温度、蛋白载量、pH 和固定化时间等条件进行了研究,结果显示, pH 条件和固定化载体的蛋白载量对固定化酶的质量影响最明显,最佳固定化条件为:温度 25℃,载体蛋白载量 20 mg/g, pH=8.0,固定化时间 6 h。结果显示,固定化酶蛋白载量并非越大越好,过大的蛋白载量不仅浪费液酶原料,还可能限制酶的活性中心与底物的结合。另外,在对固定化酶的性质和稳定性研究中发现,在 pH 为 7.5~8.0、反应温度为 40~50℃ 的条件下,固定化酶催化反应效果较理想,而在 pH=7.5 及 40℃ 的反应条件下连续反应 20 批次后,各批次反应转化率波动不大,固定化酶未见失活现象。在以上研究条件下,固定化核苷磷酸化酶的性能和稳定性皆有良好表现,可达到产业化生产应用的要求。

作者简介:黄炯威(1978-),男,工程师,研究方向为生化药

高效液相色谱法测定益母草碱大鼠血浆浓度 及其药代动力学研究

袁承军¹, 袁浩宇², 俞瑜², 王鹏²

(1. 四川省绵阳市中心医院, 四川 绵阳 621000; 2. 核工业四一六医院药剂科, 四川 成都 610051)

摘要:目的 建立测定大鼠血浆中益母草碱质量浓度的高效液相色谱(HPLC)法,并研究益母草碱在大鼠体内的药代动力学特征。方法 8只SD大鼠尾静脉注射益母草碱后,采用HPLC法测定血浆中益母草碱的质量浓度,流动相为乙腈-0.02 mol/L磷酸二氢钾(磷酸调pH=4.0)=60:40,波长为277 nm,流速为1 mL/min,柱温为30℃。结果 益母草碱在大鼠体内分布符合二室模型,主要药代动力学参数消除半衰期($t_{1/2\alpha}$)为(0.46±0.13) h, $t_{1/2\beta}$ 为(2.90±1.41) h,中心室分布容积(V)为(0.46±0.07) L/kg,药时曲线下面积($AUC_{0-\infty}$)为(70.65±12.39) mg/(h·L)。结论 该方法简便、快速,可用于体内益母草碱的测定及药代动力学研究。

关键词: 益母草碱; 高效液相色谱法; 药代动力学

中图分类号: R285.5; R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2015)20-0034-02

Determination of Concentration of Leonurine in Rat Plasma by HPLC and Its Pharmacokinetics

Yuan Chengjun¹, Yuan Haoyu², Yu Yu², Wang Peng²

(1. Mianyang Municipal Central Hospital, Mianyang, Sichuan, China 621000; 2. Department of Pharmacy, 416 Hospital of Nucleus Industry Ministry, Chengdu, Sichuan, China 610051)

Abstract: **Objective** To establish the HPLC method to detect the mass concentration of leonurine in rat plasma and the pharmacokinetics was evaluated. **Methods** The mass concentration of leonurine in 8 rats was detected after intravenous injection of 20 mg/kg leonurine by HPLC. The mobile phase was acetonitrile-0.02 mol/L mono potassium phosphate (adjusting to pH=4.0 with phosphoric acid)=60:40 at the flow rate of 1.0 mL/min and detected at 277 nm, the column temperature was 30℃. **Results** The process of leonurine in rats fit two-compartment model. The main pharmacokinetic parameters were followed: $t_{1/2\alpha}$ was (0.46±0.13) h, $t_{1/2\beta}$ was (2.90±1.41) h, V was (0.46±0.07) L/kg, $AUC_{0-\infty}$ was (70.65±12.39) mg/(h·L). **Conclusion** This method was accurate, stable and sensitive, which can be used for the determination and pharmacokinetic of Leonurine.

Key words: leonurine; HPLC; pharmacokinetics

益母草碱有多种生物活性,如改善心肌缺血、增加冠脉血流量、抗凝、抗血栓形成、保护中枢神经系统、调节血脂、缩宫止血、活血化瘀、抗糖尿病等作用^[1-5]。笔者采用高效液相色谱-紫外检测器(HPLC-UV)法测定大鼠血浆中益母草碱的含量,并对益母草碱的药代动力学特征进行了研究,现报道如下。

1 仪器、试剂与动物

日本岛津 LC-2010C 型高效液相色谱仪;岛津 LC-Solution 型色谱工作站;德国赛多利斯 BS224S 型万分之一电子天平;Avanti 30 型高速离心机(Beckman 公司);XW-80 型旋涡混合器(上海医科大学实验仪器厂);盐酸益母草碱(武汉东康源科技有限公司,批号为 20120501);盐酸益母草碱对照品(成都贝斯特试剂有限公司);乙腈为色谱纯(美国 Fisher 公司);水为重蒸水;其余试剂均为分析纯。SD 大鼠 8 只,体重 180~200 g,雌雄各半,购自上海西普尔-必凯实验动物有限责任公司,合格证号为 SCXK(沪)2008-0016;试验前圈养 3 d。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Hypersil BDS C₁₈ 柱(200 mm×4.6 mm, 3 μm);检测

波长: 277 nm;流动相: 乙腈-0.02 mol/L 磷酸二氢钾(磷酸调 pH=4.0)=60:40, V/V ;流速: 1 mL/min;柱温: 30℃。

2.2 血样处理

取血浆样品 0.1 mL,加入 6% 高氯酸溶液 0.2 mL,旋涡沉淀蛋白 1 min,10 000 r/min 的速率离心 5 min,取上清液进样 50 μL,记录色谱图和峰面积,以外标法按标准曲线计算血浆中益母草碱的质量浓度。

2.3 方法学考察

专属性试验: 大鼠空白血浆、大鼠空白血浆+益母草碱对照品、大鼠尾静脉注射益母草碱后的血浆样品色谱图见图 1。益母草碱的保留时间约为 7.5 min,血浆内源性物质及其他杂质与主峰的分度度符合要求,不干扰样品的分离测定。

线性关系考察: 取不同质量浓度的益母草碱对照品溶液 20 μL,加入 0.1 mL 空白大鼠血浆中,使血浆中含益母草碱系列质量浓度分别为 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 μg/mL,照 2.2 项下方法操作,记录色谱图。以益母草碱的质量浓度(C)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标,用最小二乘法进行线性回归,得标准曲线方程 $A = 3\,526.1 C - 1\,093.3$, $r = 0.999\,4$ ($n = 7$)。结果表明,益母

物, (电话) 0750-2882338 (电子信箱) jmlgz@126.com。

参考文献:

- [1] 魏元刚,倪孟祥,葛亚文,等.来源于产气肠杆菌的嘧啶核苷磷酸化酶基因在大肠杆菌 BL21 中的表达[J]. 药物生物技术, 2007, 14(2): 94-98.
- [2] 黄炯威,莫世艺,刘宁,等.基因工程菌发酵表达核苷磷酸化酶条件的优化[J]. 中国药业, 2014, 23(7): 22-23.

[3] 闫蓬勃,邱蔚然,丁庆豹.核苷磷酸化酶的产酶条件优化的研究[J]. 药物生物技术, 2001, 8(2): 83-85.

[4] 樊华伟,傅绍军,邵志宇,等.核苷类药物酶法合成研究进展[J]. 生物技术通讯, 2005, 16(11): 690-692.

[5] 周长林,邱蔚然,周利,等.用大肠杆菌游离细胞酶法合成核苷药物[J]. 华东理工大学学报, 1997, 23(5): 535-539.

(收稿日期: 2014-07-11; 修回日期: 2015-03-04)